

Hideaki SUZUKI et al.
Filed: 11-20-2000
Atty Docket 2167-0116P
BSKB
(703) 205-8000

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

09/715172
11/20/00
U.S. PTO

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 4月21日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-121587

出 願 人

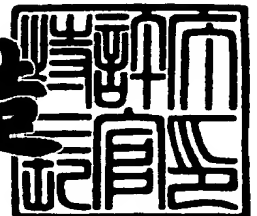
Applicant(s):

大日精化工業株式会社

2000年 9月18日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3072260

【書類名】 特許願

【整理番号】 KM-039

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/00
C12N 5/10

【発明者】

【住所又は居所】 東京都日野市南平四丁目 1 9 番 2 号 多摩南平パークス
クエア 1 1 9 号

【氏名】 青木 洋祐

【発明者】

【住所又は居所】 東京都足立区堀之内一丁目 9 番 4 号 大日精化工業株式
会社 技術研究センター内

【氏名】 鈴木 英明

【発明者】

【住所又は居所】 東京都足立区堀之内一丁目 9 番 4 号 大日精化工業株式
会社 技術研究センター内

【氏名】 高橋 樹由

【発明者】

【住所又は居所】 東京都足立区堀之内一丁目 9 番 4 号 大日精化工業株式
会社 技術研究センター内

【氏名】 葛城 寿史

【特許出願人】

【識別番号】 000002820

【氏名又は名称】 大日精化工業株式会社

【代表者】 高橋 靖

【代理人】

【識別番号】 100087918

【弁理士】

【氏名又は名称】 久保田 耕平

【電話番号】 03(3264)8091

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067069

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9704477

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒトメダラシンの免疫学的測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト血液試料を、溶血剤を含有する水性液体で処理して該ヒト血液試料中の白血球を完全に破壊した後に、抗ヒトメダラシン抗体を用いてヒトメダラシンを定量することを特徴とするヒト血液試料中のヒトメダラシンの免疫学的測定方法。

【請求項 2】 ヒト血液試料を、溶血剤を含有する水性液体で処理して該ヒト血液試料中の白血球を完全に破壊した後に、不溶性担体に固定化した抗ヒトメダラシン抗体及び標識抗ヒトメダラシン抗体と接触させて抗原抗体反応によりサンドイッチ錯体を形成させてヒトメダラシンを不溶性担体上に捕捉し、次いで該錯体中の標識を定量することにより、ヒト血液試料中のヒトメダラシンを定量することを特徴とするヒトメダラシンの免疫学的測定方法。

【請求項 3】 前記溶血剤が、界面活性剤である請求項 1 または 2 に記載のヒト血液試料中のヒトメダラシンの免疫学的測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、血液中のヒトメダラシンの免疫学的測定方法に関するものであり、さらに詳しくは、血液中のヒトメダラシンの含有量を正確に測定するための血液試料の前処理を含む免疫学的測定方法に関するものである。

【0002】

【従来技術】

セリンプロテアーゼの一種であるメダラシンは顆粒球等に存在し、炎症、特に慢性炎症の発現を含めて広く生体防御機構において重要な役割を演じていると考えられる。顆粒球メダラシンは多くの慢性炎症性疾患の増悪期で増大し、寛解期で正常化するが、多発性硬化症の患者では増悪する数日前に著増し、寛解に先行して正常化することが認められている。多発性硬化症は、中枢神経系の白質における限局性の脱髄巣とグリオーシスの出現を特徴とし、寛解と悪化を繰り返す

がら進行し、多くは、10年～15年の経過で死亡すると云う慢性炎症性の難病である。多発性硬化症の原因については、未だ、はっきりとは解明されていないが、ウイルスや細菌が免疫系を刺激して抗体が自らの神経組織を攻撃する自己免疫疾患の一種ではないかと考えられている。また、その診断法はなかなか難しく、核磁気共鳴造影法（MRI）等によって行なわれているのが現状であるが、MRI等の方法は非常に大がかりな装置を用い、測定操作も熟練を要し、経費もかかるので、簡便な検査で病気の診断、病勢の把握、予後の推定等が行なえる方法の開発が検討された結果、血液中の顆粒球メダラシン活性の測定方法が研究され、簡便に測定できる免疫学的測定方法の開発が行われている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、血液中のメダラシン含有量の免疫学的測定方法において、血液試料を水性媒体で希釈して測定する際に、顆粒球中に存在するメダラシンを完全に顆粒球の外に放出させるような処理を施すことなく測定を行うとその測定値の再現性が必ずしも良くなく、測定値にばらつきを生じる現象が認められた。従って、血液中のヒトメダラシンを免疫学的に再現性良く測定する測定方法の開発が望まれていたが、本発明は、上記事情に鑑みヒト血液試料に特定の前処理を施すことを含むヒト血液試料中のヒトメダラシンを再現性良く正確に測定できる免疫学的測定方法を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

そこで、本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意研究を行なった結果、ヒト血液試料を、ヒト血液の浸透圧と異なる特定のより浸透圧を有する水性液体で処理して白血球を完全に破壊した後に、抗ヒトメダラシン抗体を用いてヒトメダラシンを免疫学的に測定することにより、血液中のヒトメダラシンを再現性良く正確に測定できることを見出し、これらの知見に基づいて本発明の完成に到達したものである。

【0005】

即ち、本発明の第一は、ヒト血液試料を、溶血剤を含有する水性液体で処理し

て白血球を完全に破壊した後に、抗ヒトメダラシン抗体を用いてヒトメダラシンを定量することを特徴とする血液試料中のヒトメダラシンの免疫学的測定方法に関するものである。

【0006】

また、本発明の第二は、ヒト血液試料を、溶血剤を含有する水性液体で処理して白血球を完全に破壊した後に、不溶性担体に固定化した抗ヒトメダラシン抗体及び標識抗ヒトメダラシン抗体と接触させて抗原抗体反応によりサンドイッチ錯体を形成させてヒトメダラシンを不溶性担体上に捕捉し、次いで該錯体中の標識を定量することにより、ヒト血液試料中のヒトメダラシンを定量することを特徴とするヒト血液試料中のヒトメダラシンの免疫学的測定方法に関するものである。

【0007】

【発明の実施の形態】

以下、本発明につき更に詳しく説明する。

本発明のヒトメダラシンの免疫学的測定方法において測定されるべきヒト血液試料中のヒトメダラシンの大部分は、血液中に存在する白血球成分の一つである顆粒球の内部に存在しているので、顆粒球を完全に破壊してヒトメダラシンを全て細胞外に放出させてから測定することが正確な測定値を得るための必須要件である。従って、この必須要件が完全に満たされない場合には測定値はバラツキが大きく、再現性の乏しいデータしか得られないという難点が生ずる。

【0008】

血液試料中の顆粒球を完全に破壊する方法としては、機械的方法、超音波による方法、凍結融解を繰り返す方法、浸透圧の異なる水性液体で処理する方法、及び酵素類、補体等で細胞膜を破壊する方法等を挙げることができるが、本発明者らの広範な検討の結果、これらの方法に比較してさらに測定精度が高く、比較的簡便に実施できる実用的方法として、細胞膜を穏和な条件で破壊することができる薬剤である溶血剤を含有する水性液体で血液試料を処理する方法に着目したものである。

【0009】

溶血剤としては、高級脂肪酸塩、アルキルアリールスルホン酸塩、アルキルスルホン酸塩、アルキル硫酸エステル塩等の陰イオン性界面活性剤、アルキルピリジニウム塩、アルキルトリメチルアンモニウム塩等の陽イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル等の非イオン性界面活性剤、アルキルベタイン等の両性界面活性剤、サポニン、レシチン、コール酸等の天然界面活性物質、ヘビ毒、ハチ毒、プロテアーゼ等の酵素類、補体等の生体成分等がその具体例として非限定的に挙げられる。このような溶血剤は、0.0001重量%～10重量%、好ましくは0.001重量%～5重量%、特に好ましくは0.005重量%～1重量%の水性液体として用いることができる。水性液体の媒体としては、水又は水と混和する有機溶媒との混合媒体等を挙げることができる。また、該水性液体の使用量は、血液試料に対して容積単位で50倍～10万倍、好ましくは100倍～1万倍、特に好ましくは500倍～2千倍である。

【0010】

このようにして得られた顆粒球を完全に破壊したヒト血液試料の水性稀釈液を試料とするヒトメダラシンの免疫学的測定方法は、測定試料を標識化した抗原又は抗体の存在下に抗ヒトメダラシン抗体と接触させ、抗原抗体反応により標識化免疫複合体として捕捉する免疫反応段階と、生成した該免疫複合体をその分子中に存在する標識物質を用いて測定する検出段階とからなる。

【0011】

前段の免疫反応段階を構成する抗原抗体反応の方法は任意である。

例えば、

- ①不溶性担体に結合した抗体に試料中の測定すべき抗原を捕捉させた後に標識化抗体を反応させる抗体－抗原－抗体からなるサンドイッチ錯体を形成させるサンドイッチ法、
- ②サンドイッチ法において、不溶性担体に結合した抗体と異なる動物種に由来する抗体を用い、生成したサンドイッチ錯体に対して、更にこの抗体に対する標識した第二抗体を反応させる二抗体法、
- ③不溶性担体に結合した抗体に試料中の測定すべき抗原を標識化抗原（例えばペ

ルオキシダーゼ酵素により標識)の存在下で反応させる競合法、

④測定すべき抗原を含有する試料にこれらと特異的に反応する標識化抗体を作用させて凝集沈殿させた後、遠心分離により分離した免疫複合体中の標識物質を検出する凝集沈殿法、更に、

⑤ビオチン標識化抗体に標識化アビジンを反応させるビオチン-アビジン法等を非限定的に用いることができる。

【0012】

本発明のヒトメダラシンの免疫学的測定方法において不溶性担体を用いる場合には、不溶性担体としては、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライド等の高分子化合物、その他、ガラス、金属、磁性粒子及びこれらの組み合わせ等が挙げられる。また、不溶性担体の形状としては、例えば、トレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、マイクロプレート、試験管等の種々のものを採用することができる。

【0013】

また、これら不溶性担体への抗原又は抗体の固定化方法は任意であるが、物理的吸着法、共有結合法、イオン結合法等を用いることができる。

なお、本発明のヒトメダラシンの免疫学的測定方法において用いられる抗体類のクラスは任意であるが、IgG クラスの抗体が好適に用いられる。抗体はモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のいずれをも使うことも可能であるが、モノクローナル抗体が好ましい。また、その形態としては全抗体又は $F(ab')_2$ 、Fab 等の断片を用いることができる。抗体の起源は任意であるが、マウス、ラット、兎、羊、山羊、鶏等に由来する抗体が好適に用いられる。

【0014】

次いで、このようにして捕捉されたヒトメダラシンの標識化免疫複合体を検出段階で測定するための標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質及び放射性物質等を使用するのが好適である。このような酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ等、蛍光物質としては、フルオレッセインイソシアネート、フィコビリプロテイン等、発光物質としては

、ルミノール類、ジオキセタン類、アクリジニウム塩類等、放射性物質としては ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 等を非限定的に挙げることができる。標識物質が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤、蛍光剤、及び発光剤等が用いられる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質として過酸化水素等を用い、発色剤として2,2'-アジノジ[3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩(ABTS)、5-アミノサリチル酸、*o*-フェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン等、蛍光剤としては4-ヒドロキシフェニル酢酸、3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸等、発光剤としてはルミノール類、ルシゲニン電荷移動錯体(例えば、国際公開公報WO00/09626号参照。)等を用いることができる。また、酵素としてアルカリホスファターゼを用いる場合には、基質として4-ニトロフェニルホスフェート、4-メチルウムベリフェリルホスフェート、コルチゾール-21-ホスフェート等、酵素として β -D-ガラクトシダーゼを用いる場合には、2-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド、4-メチルウムベリフェリル- β -D-ガラクトシド、3-(2'-スピロアダマンタン)-4-メトキシ-4(3'- β -D-ガラクトシルオキシフェニル)-1,2-ジオキセタン(AMPGD)等を用いることができる。

【0015】

本発明のヒトメダラシンの免疫学的測定方法に使用することができるポリクローナル抗体は、従来公知の方法でヒトメダラシンを抗原として動物に免疫して得られる抗ヒトメダラシン抗血清の抗体成分として分離精製されたものを用いることができる。なかでも例えば、山羊抗ヒトメダラシン-ポリクローナル抗体、兔抗ヒトメダラシン-ポリクローナル抗体等が好適に用いられる。また、モノクローナル抗体及びその製造方法については、先に出願された特開平11-151085公報に詳細に説明されている。

【0016】

本発明のヒトメダラシンの免疫学的測定方法に使用することのできる抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体は、健常人血液から分離した顆粒球より抽出したヒトメダラシンで免疫した動物から採取した抗体産生細胞とミエローマ細胞との細

細胞融合により作製されるハイブリドーマを培地上で培養するか、又は動物腹腔内に投与して腹水内で増殖させた後、該培養物又は腹水から採取することにより製造することができる。即ち、抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、いわゆる細胞融合により得られるものであり、抗原としてヒトメダラシンを用いて免疫した動物から抗体産生細胞を採取し、これをミエローマ細胞と融合させることにより得られたハイブリドーマを選択的に増殖させ、該ハイブリドーマから抗体産生ハイブリドーマを検索しクローニングにより目的とするモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを製造することができる。

【 0 0 1 7 】

抗体産生細胞としては、例えばヒトメダラシン又はこれを含む組成物又は細胞を投与して免疫した動物から得られる脾臓細胞、リンパ節細胞、B-リンパ球等が挙げられる。免疫する動物としてはマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウマ等が挙げられる。免疫は、例えばヒトメダラシンをそのまま又は適当なアジュバントと共に動物の皮下、筋肉内又は腹腔内に約 $1 \mu\text{g}/\text{回}$ ～ $1 \text{mg}/\text{回}$ を 1 回/月～2 回/月、1 ヶ月間～6 ヶ月間投与することにより行なわれる。抗体産生細胞の分離は、最終免疫から 2 日後～4 日後に免疫動物から採取することにより行なわれる。

【 0 0 1 8 】

ミエローマ細胞としては、マウス、ラット由来のもの等を使用することができる。抗体産生細胞とミエローマ細胞とは同種動物由来であることが好ましい。

細胞融合の方法は任意であるが、例えばダルコッペ改変イーグル培地 (DME M) 等の培地中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコール等の融合促進剤の存在下で混合することにより行なうことができる。

細胞融合終了後、DMEM等で適当に希釈し、遠心分離し、得られた沈殿をHAT培地等の選択培地に懸濁して培養することによりハイブリドーマを選択する。次いで、培養上清を用いて酵素抗体法により抗体産生ハイブリドーマを検索し、限界希釈法等によりクローニングを行ない、抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。

【 0 0 1 9 】

このようにして得られた抗体産生ハイブリドーマを利用してモノクローナル抗体を製造するには、該ハイブリドーマを培地中又は生体内で培養しモノクローナル抗体を該培養物から採取する。モノクローナル抗体を大量に製造するには、該ハイブリドーマをミエローマ細胞の由来細胞と同種の動物の腹腔内に投与し、その腹水中にモノクローナル抗体を蓄積させ、腹水から採取する方法を採取することが好ましい。

培養物又は腹水からのモノクローナル抗体の分離は、IgG 精製に通常使用される硫酸分画法、陰イオン交換体又はプロテイン A、G 等のカラムによるクロマトグラフィーによって行なうことができる。

【 0 0 2 0 】

上記の如くして得られた抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体は、これを産生するハイブリドーマの種類により 3 F 0 3、3 G 0 3、2 E 0 4、及び 1 G 1 2 の 4 種類存在する。これらのモノクローナル抗体は、いずれもグロブリンクラスは IgG で、サブクラスは IgG₁ であり、いずれの抗体も抗原であるヒトメダラシンと特異的に反応し、ヒトメダラシンの免疫学的測定方法には有用である。

【 0 0 2 1 】

【実施例】

以下、参考例と共に実施例を示し、本発明を具体的に説明する。もっとも本発明は実施例等に限定されるものではない。尚、実施例中の % は重量 % を意味する。

【 0 0 2 2 】

〔参考例 1〕

精製ヒトメダラシンの調製

健常人血液 400ml に、デキストラン（分子量 200,000～300,000）の 6 % 生理食塩水溶液を血液：デキストラン水溶液 = 2 : 1 の割合で混合し、ガラス棒等で軽にかき混ぜてから、4℃～8℃の温度で約 1 時間静置した後、沈殿した赤血球を上清と分離し、この上清を 15,000rpm で遠心分離して沈殿を採取して白血球を得た。次に、この白血球に 1mM エチレンジアミン 4 酢酸 2 ナトリウム塩（EDTA）、1mM p-クロロマーキュリー安息香酸（PCMB）を含む pH7.0 の 1M リン

酸カリウム緩衝液（PKB）からなる抽出用液を加えて、攪拌下に37℃の温度で20分間インキュベートした後、15秒間超音波破碎機にかけて完全に細胞を破碎し、更に、37℃の温度で20分間インキュベートしてから、4℃の温度において12,000rpmで10分間遠心分離して上清を採取し、この上清を蒸留水に対して透析し、沈渣は上記と同様の操作を数回繰り返して抽出を行なった。次いで、この抽出液を50mM PKB（pH6.0）で平衡化したCM-セファロースゲルカラムに通した後、同じ緩衝液で洗浄してから、1M PKB（pH6.0）で吸着物を溶出し、溶出液を蒸留水に対して一晚透析して脱塩してから、コロジオン膜で濃縮することにより、精製ヒトメダラシン 1.5mgが得られた。

【0023】

〔参考例2〕

抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体の調製

(1)抗体産生細胞とミエローマ細胞の細胞融合によるハイブリドーマの作製

参考例1でヒト顆粒球から抽出、精製したヒトメダラシンを、フロイント完全アジュバントで乳化し、7週齢のBALB/Cマウスの皮下に50 μ g/匹の量で投与した。そして、4週間後にこのマウスに初回と同様の方法で追加免疫を行ない、7日後に血中に抗体量が増大したことを確認した後、更に、その7日後に最終免疫として抗原を腹腔に50 μ g/匹の量で投与した。一方、20%の牛胎児血清を添加したダルコッペ改変イーグル（DMEM）培地中で、マウスミエローマ細胞 P3-X63-Ag8-U1（P3U1）を維持培養しておき、最終免疫の3日後、このマウスから脾臓細胞を採取して、これをポリエチレングリコール4000を用いてP3U1と細胞融合させ、96穴マイクロプレートに撒いた。細胞融合後、培地を100 μ M ヒポキサンチン、0.4 μ M アミノプテリン、16 μ M チミジンを添加したDMEM（HAT培地）に置換して、2～3週間選択培養することにより脾臓細胞とミエローマ細胞との融合体であるハイブリドーマが得られた。

【0024】

(2)抗ヒトメダラシン抗体産生性ハイブリドーマのスクリーニング

次に、このハイブリドーマの培養液中の抗体活性を、ELISA（Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay）でスクリーニングした。即ち、ヒトメダラシンをE

L I S A 用のマイクロプレートに吸着させ、pH7.4 の10mMリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) に2%の牛血清アルブミン (B S A) を添加した溶液でブロッキング処理を行なった後、ハイブリドーマ培養液50 μ l をこのマイクロプレートに添加して1時間放置してから、ハイブリドーマ培養液を除去して洗浄し、これにペルオキシダーゼ標識山羊抗マウス I g G - F c 特異抗体の 2 μ g/ml P B S 溶液 100 μ l を添加し、37℃で1時間反応させた。次いで、この酵素標識抗体溶液を除去し洗浄した後、0.05% A B T S、及び0.0034%過酸化水素を含む 0.1M リン酸クエン酸緩衝液 (pH4.6) を 200 μ l 添加して発色させることにより抗ヒトメダラシン抗体産生性ハイブリドーマを選別した。

【0025】

(3)抗体産生株のクローニング及びモノクローナル抗体の作製

この抗ヒトメダラシン抗体産生性ハイブリドーマ培養液を採取し、限界希釈法によるクローニングを行なって最終的に単一クローンのハイブリドーマ4種類を得た。このハイブリドーマを、夫々、プリスタン投与 B A L B / C マウスの腹腔に投与して増殖させ、モノクローナル抗体を含む腹水を得た。次いで、得られた腹水に50%飽和硫酸を加えて抗体を沈殿させ、この沈殿を分離して P B S に溶解させ、3M NaCl 含有50mMトリスー塩酸緩衝液 (pH7.8) に対して透析してから、プロテインAーセファロース C L 4 B カラム (ファルマシア社製) にかけた後、吸着した抗体を0.1Mグリシンー塩酸緩衝液 (pH5.0) で溶出し中和して精製することにより3F03、3G03、2E04、及び1G12からなる4種類のモノクローナル抗体を得た。

【0026】

(4)モノクローナル抗体の性質

〔ウェスタンブロッティング法〕

モノクローナル抗体に特異的な抗原をウェスタンブロッティング (Western blotting) 法を用いて固定した。

まず、ヒト顆粒球由来メダラシンを S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた後、電解液バッファーに25mMグリシン、及び20%メタノールを含む溶液を用い、電圧傾斜が7 V/cm、2時間の条件でスラブゲルから蛋白をニトロセル

ロースシートへ移した。次に、ニトロセルロースシートの各レーンを切り離し、一方のシートをアミドブラックで蛋白染色し、他方は次の様な酵素免疫アッセイを行なった。即ち、2% BSA/PBS でブロッキング処理した後、1次抗体としてマウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体を加え、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識山羊抗マウス IgG-Fc 特異抗体を加えて反応させ、洗浄してから、0.04% 3,3'-ジアミノベンジジン、及び0.0034%過酸化水素を含むPBS からの基質溶液を加えて発色させることにより、4種のマウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体は、ヒト顆粒球由来メダラシンを認識することが確認された。

【 0 0 2 7 】

〔インヒビション・アッセイ法〕

ELISA用マイクロプレートに固定したヒトメダラシンに対して、ビオチン化した第一の抗体と非標識の第二の抗体を共存させて反応させた後、アビジン化ペルオキシダーゼを反応させ、次いで、このペルオキシダーゼを基質溶液の添加により発色させてビオチン化抗体の反応量を測定するインヒビション・アッセイ (Inhibition assay) 法により、いずれの2つの組み合わせにおいてもビオチン化抗体の反応量に変化がないことより、4種のモノクローナル抗体はいずれも互いに異なるエピトープ (抗原部位) を認識することが確認された。

【 0 0 2 8 】

〔実施例 1〕

ヒトメダラシン測定用検量線の作成

(1)モノクローナル抗体固定化ビーズの調製

ポリスチレン製ビーズ (直径 6 mm) をよく洗浄してから、マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (2E04) 10 μ g/ml を含む PBS (pH7.4) 溶液中に 4℃ の温度で 1 昼夜放置した後、PBS で洗浄し、1% BSA 水溶液に 4℃ の温度で 1 昼夜放置してブロッキング処理を施すことによりモノクローナル抗体固定化ビーズが得られた。

【 0 0 2 9 】

(2)ペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体の調製

マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (2E04) 1.0mg/mlを含むPBS溶液に、N-(m-マレイミド安息香酸)-N-サクシンイミドエステル (MBS) の10mg/mlの濃度のジメチルホルムアミド溶液 0.1mlを添加し、25℃の温度で30分間反応させる。次いで、この反応混合液をセファデックスG-25を充填したカラムを用い、0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.0)でゲル濾過を行ない、マレイミド化モノクローナル抗体と未反応MBSとを分離した。

一方、ペルオキシダーゼとしてホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (HRP) の1.0mg/mlのPBS溶液に、N-サクシンイミジル-3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート (SPDP) の10 mg/mlの濃度のエタノール溶液を添加し、25℃の温度で30分間反応させる。次いで、この反応混合液をセファデックスG-25を充填したカラムを用い、10mM酢酸緩衝液 (pH4.5)でゲル濾過して精製、ピリジジスルフィド化HRPを含有する画分を採取し、これをコロジオンバック中において氷冷下に約10倍に濃縮する。次に、これに0.1M ジチオスレイトールを含有する0.1M 酢酸緩衝生理食塩水 (pH4.5) 1mlを添加して、25℃の温度で30分間攪拌してHRP分子中に導入したピリジジスルフィド基を還元した後、この反応混合液をセファデックスG-25を充填したカラムを用いてゲル濾過し、チオール化HRPを含有する画分が得られた。

次に、マレイミド化モノクローナル抗体とチオール化HRPとを混合し、コロジオンバックを用いて氷冷下に4 mg/mlの蛋白質濃度まで濃縮し、4℃で一昼夜放置した後、ウルトロゲルAcA44 (SEPRACOR社)を充填したカラムを用いてゲル濾過し、ペルオキシダーゼ酵素標識モノクローナル抗体が得られた。

【0030】

(3)ヒトメダラシンのサンドイッチ酵素免疫測定方法

マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (3F03)を固定化したビーズ各1個と、精製したヒトメダラシン (標準物質) 0, 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 200ng/mlの濃度で含有する2%BSA含有PBS溶液50 μ lと、HRP標識マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (2E04)0.2 μ g/mlの濃度で含有する2%BSA含有PBS溶液 350 μ lとを加え37℃の温度で30分間インキュベートし、次いで試験管内の溶液を吸引除去した後、生理食塩水で洗浄する。次に、試験管内

に 0.015% 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩水溶液 250 μ l、及び 0.0034% 過酸化水素を含む 0.1M リン酸クエン酸緩衝液 (pH4.5) を 250 μ l ずつ各試験管内に加え、37℃の温度で30分間インキュベートした後、反応停止剤として 1N硫酸を500ml ずつ加えて酵素反応を停止させてから、分光光度計を用いて450nmの波長の吸光度を測定し、これを標準物質濃度に対してプロットすることにより、図1に示されるような濃度依存性の良好な検量線が得られた。

【0031】

〔実施例2〕

酵素免疫測定方法による臨床検体中のヒトメダラシンの測定

健常人及び多発性硬化症患者血液を採取して凍結保存した試料を室温に戻して融解させ、その10 μ l を採取して0.01%のドデシルトリメチルアンモニウムブロマイドを含有する精製水 2ml 中に加えボルテックスミキサーを用いて十分混合して検体溶液とし、その10 μ l を試験管に添加する。次いで、これに2% BSA 含有 PBS (pH7.4) 40 μ l を加えて希釈した後、この試験管にマウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (3F03) を固定化したビーズ各1個及びHRP標識マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (2E04) 0.2 μ g/mlの濃度で含有する2% BSA 含有 PBS 溶液 350 μ l を添加して37℃の温度で30分間インキュベートした。次に、前述の検量線を作成する場合と全く同じ操作により、洗浄、酵素反応及び反応停止を行った後、分光光度計を用いて 450nmの波長の吸光度を測定し、検量線よりヒトメダラシン濃度を求めた。この測定の再現性を検討する目的で測定操作を検体希釈処理から別個に5回行った結果、検体血液中のヒトメダラシン濃度は、第1表に示すように非常に良好な再現性を示すことが確認された。

【0032】

【表 1】

第1表 血液中ヒトメダラシン測定値

測定回	測定値 ($\mu\text{g/ml}$)	
	健常人	患 者
1	8.3	39.6
2	8.1	38.8
3	8.3	39.2
4	8.4	40.1
5	7.9	39.5
平均	8.2	39.4
変動係数(%)	2.4	1.2

【0033】

〔比較例1〕

酵素免疫測定方法による臨床検体中のヒトメダラシンの測定

健常人及び多発性硬化症患者血液を採取して凍結保存した試料を室温に戻して融解させ、その $10\mu\text{l}$ を採取してPBS (pH7.4) 2ml中に加え均一に混合して検体溶液とし、その $10\mu\text{l}$ を試験管に添加し、これに2%BSA含有PBS (pH7.4) $40\mu\text{l}$ を加えて希釈した。次に、この試験管にマウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (3F03) を固定化したビーズ1個及びHRP標識マウス抗ヒトメダラシンモノクローナル抗体 (2E04) $0.2\mu\text{g/ml}$ の濃度で含有する2%BSA含有PBS溶液 $350\mu\text{l}$ を添加して 37°C の温度で30分間インキュベートした。次に、前述の検量線を作成する場合と全く同じ操作により、洗浄、酵素反応及び反応停止を行なった後、分光光度計を用いて 450nm の波長の吸光度を測定し、検量線よりヒトメダラシン濃度を求めた。この測定の再現性を検討する目的で測定操作を検体希釈処理から別個に5回行った結果、検体血液中のヒトメダラシン濃度の測定値は第2表に示すように再現性が良好とは云えないデータを示した。

【0034】

【表 2】

第2表 血液中ヒトメダラシン測定値

測定回	測定値 ($\mu\text{g/ml}$)	
	健常人	患 者
1	7.4	25.8
2	6.8	30.4
3	6.2	32.7
4	7.6	23.9
5	5.9	29.1
平均	6.8	28.4
変動係数(%)	10.9	12.5

【0 0 3 5】

【発明の効果】

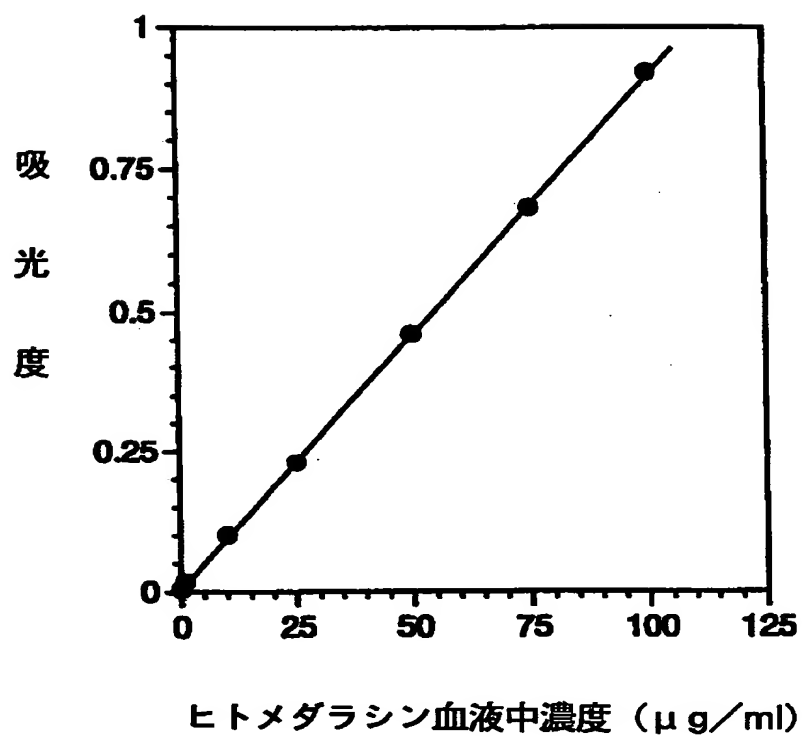
以上説明したような発明の構成をとることにより、ヒト血液試料中のヒトメダラシン量を再現性よく正確に測定することが可能となり、慢性炎症性疾患、特に多発性硬化症の血液診断等への利用に寄与するところが大きい。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 実施例 1 記載の酵素免疫測定方法を用いてヒトメダラシン（標準物質）を測定し、その吸光度を抗原濃度の関数としてプロットして作成したヒトメダラシン測定用の検量線である。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 抗ヒトメダラシン抗体を用いて血液中の顆粒球等に存在し、その増減により多発性硬化症の発現の把握に利用可能な血液中のヒトメダラシンの濃度をより正確に測定することが可能な方法を提供する。

【解決手段】 抗ヒトメダラシン抗体を用いて血液中のヒトメダラシンを測定する際に、溶血剤を含有する水性液体で血液試料を処理して白血球を完全に破壊した後、前記抗体を用いて血液中のヒトメダラシンの含有量を再現性良く正確に測定する免疫学的測定方法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-121587
受付番号	50000510456
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成12年 4月24日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成12年 4月21日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002820]

1. 変更年月日	1990年 8月22日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区日本橋馬喰町1丁目7番6号
氏 名	大日精化工業株式会社